Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 173- 186

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۱۸۶-۱۷۳

مقاله علمی- پژوهشی

تعیین مقدار کافئین در انواع قهوه و بررسی تاثیر روش کچرز بر میزان استخراج آن در مقایسه با روش متداول

مرضیه معین‌فرد[1*]- پانیذ خالوکرمانی[2]- شیما جلدانی[3]- علی شریف[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۷

چکیده

قهوه از یکی از مهم‌ترین و پرطرف‌دارترین نوشیدنی‌ها در دنیا به‌شمار می‌رود به‌طوری که از لحاظ تنوع روش‌های تهیه بر سایر نوشیدنی‌های مشابه مانند چای برتری دارد. در میان ترکیبات مختلف موجود در دانه قهوه، کافئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کافئین یک آلکالوئید طبیعی است که می‌تواند بسته به میزان مصرف، خواص مثبت (بهبود حافظه، افزایش هوشیاری و تمرکز) یا منفی (سردرد، اضطراب و بی قراری) بر سلامت مصرف‌کننده داشته باشد. از طرف دیگر، مقدار زیاد کافئین موجود در دانه قهوه به‌عنوان یک عامل مزاحم در آنالیز آلاینده‌ها عمل می‌کند و باید تا حد ممکن از عصاره حذف شود. از این‌رو پژوهش حاضر دو هدف کلی را دنبال کرد. در مرحله اول ۱۸ نوع قهوه، اعم از انواع کلاسیک (جوشیده، فرانسوی، موکا و فیلتر شده) و تجاری (انواع اسپرسو، قهوه فوری و قهوه سرد) از لحاظ میزان کافئین مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله دوم، تاثیر دو روش (روش کچرز و متداول) بر میزان استخراج کافئین از پودر قهوه ربوستا، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این پژوهش مؤید تاثیر قابل ملاحظه واریته بر میزان کافئین بود به نحویکه قهوه‌های تهیه شده از دانه ربوستا کافئین بیشتری را نسبت به دانه‌های عربیکا دارا بودند. در میان انواع قهوه کلاسیک، بیشترین میزان کافئین (۲۶±۱۰۴۴ میلی‌گرم بر لیتر) از قهوه موکا استخراج شد. در میان انواع تجاری، میزان قهوه به آب متفاوت بود لذا میزان کافئین بر حسب مقدار دریافت از هر فنجان مورد ارزیابی قرار گرفت. در این میان، انواع اسپرسو، خصوصا نوع پاد محتوی بیشترین میزان کافئین (۱۶±۱۳۷۱ میلی‌گرم بر لیتر معادل ۰/۶±۵۴ در هر فنجان ۴۰ میلی‌لیتری) بودند. در مقابل کمترین میران کافئین از قهوه سرد به‌دست آمد. بررسی روش استخراج قهوه نیز نشان داد که روش کچرز قادر است کافئین را به شکل قابل ملاحظه‌ای (حدود ۲۰٪ کاهش در مقایسه با روش متداول) از عصاره قهوه حذف کند که احتمالا بر کاهش اثر مداخله کننده این ترکیب در آنالیز آلاینده‌ها که معمولا در مقادیر بسیار کم در نمونه‌ها وجود دارند، تاثیر مثبت خواهد داشت. به‌طورکلی، استفاده از حلال استونیتریل و استفاده‌همزمان از جاذب‌های PSA و C18، کاهش معنادار استخراج کافئین را به دنبال داشت.

واژه‌های کلیدی: کافئین، قهوه، عربیکا، ربوستا، کچرز

مقدمه

کافئین (۱،۳،۷-تری‌متیل‌گزانتین) با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}N_4O_2$، یک آلکالوئید طبیعی و یک محرک سیستم عصبی مرکزی با وزن مولکولی ۱۹۴گرم بر مول است که در دانه‌های قهوه و کاکائو و برگ‌های چای به مقدار زیاد یافت می‌شود. مصرف روزانه مواد غذایی و نوشیدنی‌های حاوی کافئین (مانند انواع شکلات، قهوه، چای، و نوشیدنی‌های بدون الکل) و همچنین استفاده گسترده از آن در تهیه انواع داروها (مانند داروهای سرماخوردگی و مسکن‌ها)، باعث شده است تا این ترکیب به عنوان متداول‌ترین داروی مصرفی در سراسر جهان شناخته شود (Li *et al*., 2020; Nawrot *et al*., 2003). متوسط مصرف کافئین، ۷۰ میلی‌گرم به ازای هر نفر در هر روز است که بیانگر مصرف بالای آن در جوامع مختلف است (Buerge *et al*., 2003). کافئین به سرعت از طریق دستگاه گوارش جذب شده و وارد جریان خون می‌شود به‌نحوی که بعد از گذشت ۱ الی ۱/۵ ساعت، غلظت آن در خون به حداکثر رسیده و به سرعت در کل بدن توزیع می‌شود (Nawrot *et al*., 2003). تاثیرات مفید کافئین بر خلق و خوی، افزایش هوشیاری و کاهش خستگی به اثبات رسیده، بویژه در شرایط سطح هوشیاری پائین، این تاثیرات بسیار مفید هستند به نحوی که مصرف کافئین برای رفع اختلالات عملکردی ناشی از خستگی، کار شبانه و بیماری‌های خفیف مانند سرماخوردگی تجویز می‌شود (Brice and Smith 2001).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشجوی دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*-نویسنده مسئول: Email: moeenfard@ferdowsi.um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i2.86410

کافئین شناخته شده‌ترین ترکیب دانه قهوه است و مقدار آن شاخصی از کیفیت نوشیدنی قهوه محسوب می‌شود. مقدار آن در انواع قهوه بسته به نوع واریته و محل کشت متفاوت است. در قهوه عربیکا[1]، مقدار کافئین بین ۰/۸ الی ۱/۴٪ وزنی/ وزنی متغیر است. در مقابل، میزان آن در قهوه ربوستا[2] به مراتب بیشتر بوده و در محدوده۴/۰ – ۱/۷٪ وزنی/ وزنی قرار دارد (Mussatto *et al.*, 2011). یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد قهوه در مقایسه با سایر نوشیدنی‌ها مانند چای، روش‌های متنوع تهیه آن است که به شدت تحت تاثیر سلیقه مصرف‌کنندگان یا فرهنگ کشورها قرار دارد (Gloess *et al.*, 2013). علاوه بر واریته، طرز تهیه نوشیدنی نیز بر میزان کافئین تاثیر قابل توجهی دارد. درتحقیق Bell و همکاران (۱۹۹۶) میزان کافئین انواع نوشیدنی از ۵۰ تا ۱۴۳ mg/cup متغیر بود (Bell, Wetzel and Grand 1996). Sereshti و همکاران (۲۰۱۴) انواع نوشیدنی مانند چای، قهوه، کولا، ردبول و غیره را از نظر میزان کافئین مقایسه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد بعد از هایپ، کافئین قهوه (۲۶۷ µg/mL) در رتبه دوم قرار داشت (Sereshti and Samadi, 2014). اگرچه سایر محقیقن نیز مقدار کافئین را در انواع نوشیدنی قهوه مورد مطالعه قرار داده‌اند (Candeias *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2017; Jeon *et al.*, 2019)، ولی تحقیقی که مقدار کافئین را به‌صورت اختصاصی و جامع در طیف وسیعی از نوشیدنی‌ها اعم از انواع کلاسیک (جوشیده[3]، فرانسوی[4]، موکا[5] و فیلتر شده[6] تهیه شده از قهوه عربیکا و ربوستا) و تجاری (انواع اسپرسو، کپسول[7]، قهوه سرد[8]، قهوه فوری[9]) مورد مطالعه قرار دهد، انجام نشده است. به‌عنوان مثال Candeias و همکاران (۲۰۰۹)، فقط انواع قهوه اسپرسو را مطالعه کردند (Candeias *et al.*, 2009). به‌طور مشابه، Gloess و همکاران (۲۰۱۳) کافئین انواع اسپرسو و فلیتر شده را اندازه‌گیری نمودند. لازم به ذکر است که در حال حاضر بسیاری از مردم قهوه را در خانه و با روش‌های مختلف تهیه می‌کنند. بنابراین، تلاش ما بر این بود تا این نوشیدنی‌ها را با انواع قهوه‌ای که در بازار تهیه می‌شود مقایسه کنیم.

کافئین را می‌توان از منظر دیگری نیز مورد بررسی قرار داد. به‌عنوان مثال، با توجه به مقدار بالای مصرف کافئین (از طریق غذا یا دارو)، این ترکیب را می‌توان به‌عنوان یک آلاینده نوظهور نیز در نظر گرفت که به‌عنوان شاخصی از آلودگی انسانی تلقی می‌شود. این ترکیب در فاضلاب، پساب کارخانجات، ضایعات بیمارستانی و سیستم‌های مختلف آبی مانند آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی و به‌طور ویژه آب‌های قاره‌ای شناسایی شده است (Dafouz *et al.*, 2018; Hillebrand *et al.*, 2012). علاوه بر دفع مواد غذایی حاوی کافئین مانند باقی‌مانده نوشیدنی‌ها یا ضایعاتی مانند ضایعات صنعت قهوه (Li *et al.*, 2020)، سایر منابع مانند ضایعات دارویی از قبیل دفع داروی تاریخ مصرف گذشته یا دفع کافئین از بدن بیماران نقش بسیار مهمی در این میان ایفا می‌کنند (Buerge *et al.*, 2003). حضور کافئین در اندازه‌گیری آلاینده‌های سرطان‌زا مانند هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک[10] (PAH) بویژه در گیاهانی مانند چای و قهوه (که حاوی مقادیر بالای کافئین هستند)، مداخله کرده و اندازه‌گیری این ترکیبات را با مشکل مواجه می‌کند (Reichert *et al.*, 2018; Sadowska-Rociek *et al.*, 2014). لذا تاکنون روش‌های مختلفی جهت حذف کافئین از نمونه‌های مختلف به کار برده شده است (Danish 2020; Stamatis and Konstantinou 2013) تا بتوان مقدار سموم و آفت‌کش‌های سرطان‌زا را با دقت و صحت مطلوب‌تری مورد آزمون قرار داد. یکی از این روش‌های استخراج، روش کِچِرز [11] است.

روش کچرز (نام اختصاری برای روش سریع، آسان، ارزان، موثر، ناهمگون و ایمن)، تکنیکی ساده و سریع جهت آماده سازی نمونه است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط یک محقق آلمانی به نام Anastassiades، برای استخراج سموم دفع آفات از میوه‌ها و سبزیجات معرفی گردید (Anastassiades *et al.*, 2003). علاوه بر آنالیز آفت‌کش‌ها، این روش برای شناسایی و آنالیز آلاینده‌های مختلف از جمله داروها، هورمون‌ها، سموم قارچی، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و چندین نوع آلاینده آلی پایدار در ماتریس‌های غذایی و محیطی مورد استفاده قرار گرفته است (Kim *et al.*, 2019). اساس کار بر استخراج ترکیبات هدف با کمک حلال‌های آلی در حضور نمک‌هایی مانند کلریدسدیم و سولفات‌منیزیم استوار است. در مرحله بعد، پاکسازی عصاره توسط انواع جاذب‌ها انجام می‌شود. این روش برای حذف ترکیبات فنولی، اسیدهای آلی و ترکیبات رنگی، جهت آنالیز بهتر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از چای، با موفقیت به کار برده شده است (Sadowska-Rociek, Surma and Cieślik 2014).

لذا در بخش اول این پژوهش،میزان کافئین در انواع نوشیدنی قهوه اعم از انواع کلاسیک یا تجاری مورد بررسی قرار خواهد گرفت تا دریافت کافئین در هر فنجان قهوه مصرفی مشخص شود. در مرحله دوم این پژوهش ادعا می‌شود که روش کچرز به دلیل ماهیت خاص ترکیبات مورد استفاده در آن، قابلیت حذف کافئین از عصاره قهوه را

1 Arabica Coffee
2 Robusta Coffee
3 Boiled coffee
4 French press coffee
5 Mocha coffee
6 Filtered coffee
7 Espresso type capsule
8 Iced coffee
9 Instant coffee
10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)
11 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS)

دارد.استخراج کافئین به روش متداول و روش کچرز مورد مقایسه قرار گرفت تا تاثیر روش کچرز جهت حذف کافئین در تحقیقات مشابه مورد استفاده قرار گیرد. به این منظور از عصاره قهوه ربوستا، به‌عنوان سیستم مدل استفاده شد و فرآیند استخراج از جهت نوع جاذب و نوع حلال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پودر قهوه ربوستا خالص از فروشگاه معتبر خریداری شد. کافئین، کلرید سدیم، سولفات منیزیم، استات‌روی، پتاسیم‌هگزاسیانوفرات و جاذب‌های PSA[1] و اکتادسیل‌سیلان (C18)[2] از شرکت سیگما خریداری شدند. حلال‌های استونیتریل، اتیل استات، اسید استیک گلاسیال و متانول با درجه کروماتوگرافی نیز از شرکت VWR فراهم شدند.

انواع قهوه کلاسیک

قهوه عربیکا (۱۰۰ درصد *caffea arabica*) با محتوای آب ۲/۳۴ درصد وزنی/ وزنی) و قهوه ربوستا (۱۰۰ درصد *caffea robusta* با محتوای آب ۳/۱۱ درصد وزنی/ وزنی) جهت تهیه انواع نوشیدنی جوشیده، فرانسوی، موکا و فیلتر شده مورد استفاده قرار گرفتند. توزیع اندازه ذرات برای قهوه عربیکا (≤ ۵۰۰ میکرومتر ۶۵٪؛ ۵۰۰–۳۰۰ میکرومتر ۲۶٪؛ ۳۰۰–۲۰۰ میکرومتر ۴٪) و ربوستا (≤ ۵۰۰ میکرومتر ۶۳٪؛ ۵۰۰–۳۰۰ میکرومتر ۱۸٪؛ ۳۰۰–۲۰۰ میکرومتر ۱۰٪) تقریبا مشابه بود. در تهیه این نوشیدنی‌ها نسبت ۷/۵ گرم قهوه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب رعایت شد.

قهوه جوشیده

۱۱/۲۵ گرم قهوه با ۱۵۰ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حالت جوشش قرار گرفت. و بعد از ۲ دقیقه نگهداری در حالت سکون، فاز رویی جدا گردید.

قهوه فرانسوی

۱۱/۲۵ گرم پودر قهوه در قهوه‌ساز فرانسوی ریخته شده و ۱۵۰ میلی‌لیتر آب جوش به آن اضافه شد. بعد از ۲/۵ دقیقه نگهداری در حالت سکون، دو فاز با فشار دادن فیلتر فلزی قهوه‌ساز از هم جدا شدند.

قهوه موکا

۱۱/۲۵ گرم قهوه داخل فیلتر فلزی مخصوص ریخته شد. کتری موکا با ۶۰ میلی‌لیتر آب پر شده و ظرف روی حرارت قرار گرفت تا زمانی که تمام آب جوش آمده از فیلتر حاوی قهوه عبور کرد و در ظرف رویی جمع شد.

قهوه فیلتر شده

۲۲/۵ گرم قهوه روی فیلتر کاغذی مخصوص (شماره ۲) قرار گرفت و نوشیدنی قهوه با عبور ۳۰۰ میلی‌لیتر آب جوش طی مدت ۲ الی ۳ دقیقه تهیه شد.

انواع قهوه تجاری

با توجه به تهیه این نمونه‌ها از بازار، نوع و گونه قهوه مورد استفاده برای تهیه انواع نوشیدنی متفاوت بود.

قهوه اسپرسو نرمال

در فنجان‌های ۴۰ میلی‌لیتری از کافی شاپ تهیه شد.

قهوه اسپرسو (کپسول)

انواع کپسول قهوه با برندهای مختلف از بازار تهیه شدند و استخراج با دستگاه قهوه‌ساز (XN2100 ،KRUPS، آلمان) تحت دمای ۹۵–۹۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۹ بار جهت تهیه ۴۰ میلی‌لیتر نوشیدنی، انجام شد. همه کپسول‌ها دارای پوشش فلزی در سطح بودند. مقدار قهوه در کپسول‌های نوع ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به‌ترتیب در حدود ۶/۰۰، ۵/۰۱، ۵/۰۱، ۶/۱۳، ۵/۱۹، ۵/۷۱ گرم تعیین شد. از لحاظ واریته، نوع ۱، ۲، ۳ و ۵ مخلوط عربیکا و ربوستا بودند در حالیکه قهوه موجود در کپسول‌های ۴ و ۶ فقط از نوع عربیکا بود.

اسپرسو (نوع پاد[3])

قهوه پاد با محتوای ۷/۰۸ گرم قهوه (مخلوط عربیکا و ربوستا) داخل فیلتر مخصوص از بازار خریداری شد و استخراج با قهوه‌ساز مخصوص انجام گرفت.

قهوه فوری

این قهوه (مخلوط انواع عربیکا) از بازار خریداری شده و مقدار ۲ گرم آن در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب جوش حل شد.

قهوه سرد

بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده، ۸ گرم از پودر قهوه (حاوی قهوه فوری، شکر، اسید سیتریک و مواد دیگر)، در ۲۴۰ میلی‌لیتر آب سرد حل شده و به خوبی مخلوط شد.

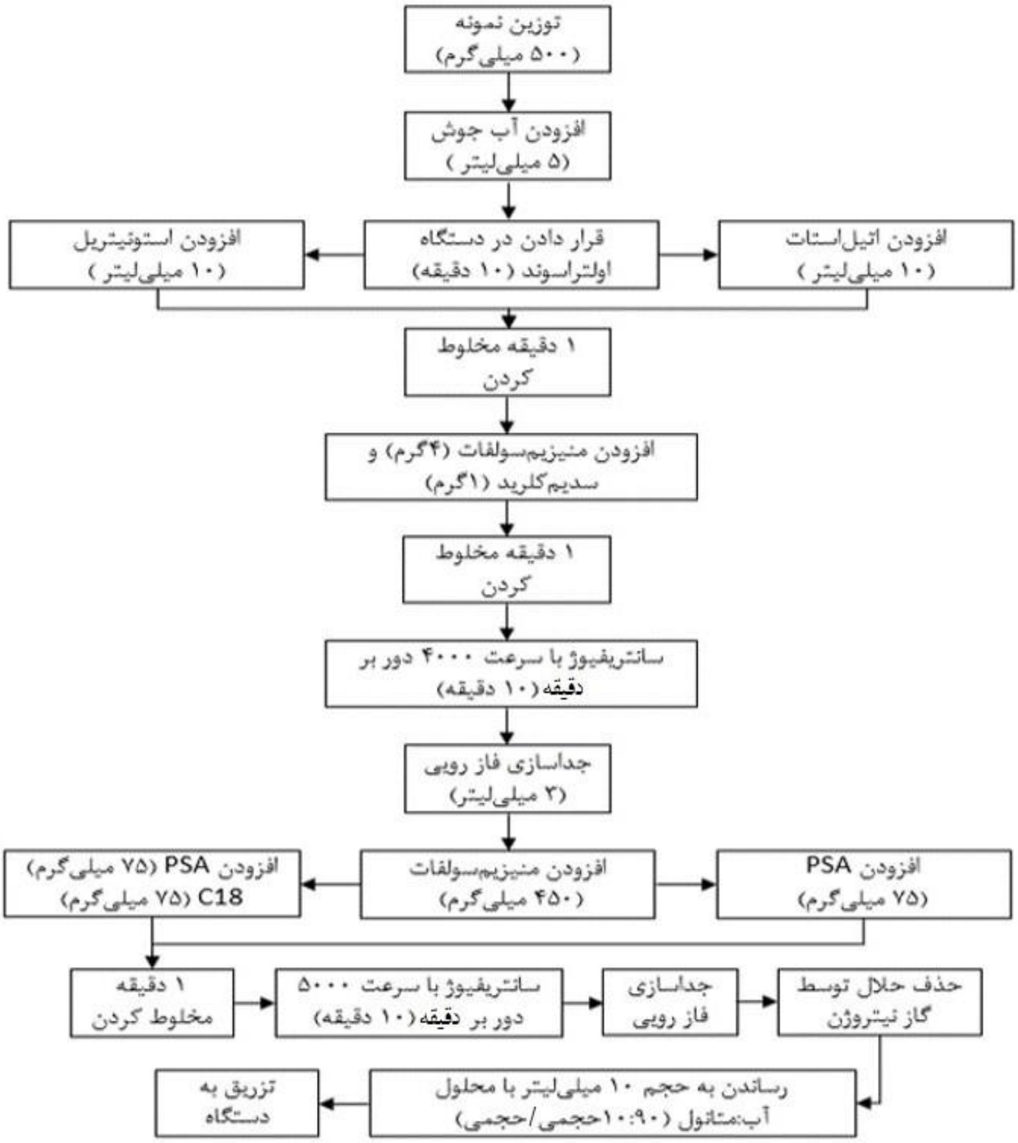
1 Primary and Secondary Amines (PSA)
2 Octadecyl silane (C18)
3 Espresso type coffee pod

استخراج کافئین به روش متداول

مقدار کافئین توسط روشی بر پایه استفاده از محلول‌های کاریز[1] I و II اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کاریز I (۱۰/۶ گرم پتاسیم هگزاسیانوفرات سه آبه با آب مقطر به حجم۱۰۰ میلی‌لیتر رسید) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کاریز II(۲۱/۹ گرم استات روی با ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ترکیب شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید) به ۲/۵ میلی‌لیتر نوشیدنی قهوه اضافه و با محلول آب: متانول (۱۰:۹۰، حجمی/ حجمی)، به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۱۰ دقیقه سکون، فاز رویی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفوژ شده و مورد آنالیز قرار گرفت (Jeon *et al.*, 2019). به‌منظور بررسی دو روش استخراج یعنی کچرز و روش متداول (بر پایه محلول کاریز) عصاره‌ای از قهوه ربوستا به‌عنوان سیستم مدل تهیه شد. بدین منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم پودر قهوه با ۵ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسوند قرار گرفت. میزان کافئین در ۲/۵ میلی‌لیتر از این عصاره همانند آنچه در بالا گفته شد، استخراج گردید.

استخراج به روش کچرز

شکل ۱، مراحل کامل استخراج کافئین به روش کچرز و با ذکر جزئیات نشان داده شده است.



شکل ۱- استخراج کافئین از عصاره قهوه ربوستا به روش کچرز

---

1 Carrez solutions I & II

جدول ۱- انواع و مقادیر حلال‌ها و جاذب‌های مورد استفاده جهت حذف کافئین به روش کچرز

متغییرها	نام ترکیب	مقدار	ترکیب جاذب و حلال مورد استفاده			
			A	B	C	D
حلال	استونیتریل	۱۰ mL	+	+	−	−
	اتیل‌استات	۱۰ mL	−	−	+	+
جاذب	PSA	۷۵ mg	+	+	+	+
	C18	۷۵ mg	−	+	−	+

به‌طور خلاصه، همانند آنچه در شکل ۱ نشان داده شد است، عصاره قهوه ربوستا از مخلوط ۵۰۰ میلی‌گرم پودر قهوه و ۵ میلی‌لیتر آب جوش تهیه شد. ۱۰ میلی‌لیتر از حلال مورد نظر (استونیتریل یا اتیل استات) به نمونه اضافه شد. در این مرحله، کلریدسدیم به همراه سولفات‌منیزیم، به عصاره اضافه شده و پس از مخلوط شدن سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی عصاره با ۷۵ میلی‌گرم جاذب (PSA یا ترکیب PSA و C18) و سولفات‌منیزیم، مخلوط و مجددا سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن فاز رویی و حذف حلال، بخش باقی مانده با محلول آب: متانول (۱۰:۹۰، حجمی/ حجمی) به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شده و آنالیز شد (Surma *et al.*, 2017). در جدول ۱، متغیرها و مقادیر مورد استفاده جهت تهیه نمونه‌ها به ترتیب با جزئیات ذکر شده است.

شناسایی و اندازه‌گیری کافئین با کمک کروماتوگرافی مایع باکارایی بالا (HPLC)[1]

شرایط آنالیز کروماتوگرافی کافئین، به طریق فاز معکوس و با کمی تغییرات از روش Candeias و همکاران (۲۰۰۹) اقتباس شد. آنالیز با HPLC (Hitachi Elite LaChromatograph، Merck، ژاپن) با کمک ستون‌های LiChroCART® RP-18 به طول ۲۵ سانتی‌متر صورت گرفت. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد و یا عصاره بعد از فیلتر کردن با فیلترهای سرنگی از نوع PTFE [2] (۰/۴۵ میکرومتر)، به ستون کروماتوگرافی تزریق شد. شرایط آنالیز از قرار زیر بود: فاز متحرک شامل متانول/ محلول آبی اسید استیک با pH معادل ۲/۸ (۳۵/۶۵ حجمی/ حجمی)، سرعت جریان ۱ mL/min و شناسایی بوسیله آشکارساز با آرایه دیود (DAD)[3] در طول موج ۲۷۳ نانومتر. جهت تعیین غلظت کافئین، محلول مادر با غلظت ۳۰۰ μg/mL با آب:متانول (۹۰:۱۰، حجمی/ حجمی) تهیه شده و سپس محلول‌های استاندارد کافئین با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ μg/mL با رقیق‌سازی محلول مادر آماده شدند. منحنی کالیبراسیون با رسم غلظت‌های استاندارد در مقابل سطح زیر نمودار به‌دست آمد.

روش آنالیتیکی مورد نظر با در نظر گرفتن پارامترهای ضریب تعیین (R^2) ، صحت (درصد بازیابی)[4]، حداقل مقدار تشخیص (LOD)[5] و حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری (LOQ)[6] اعتبارسنجی شد. تعیین درصد بازیابی به‌منظور اطمینان از صحت روش متداول (روش استفاده از محلول‌های کاریز) در استخراج کافئین، مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، محلول استاندارد با غلظت ۰/۵ mg/mL تهیه شده و استخراج کافئین از این نمونه با کمک محلول‌های کاریز انجام گرفت. درصد بازیابی از تقسیم مقدار کافئین به‌دست آمده بعد از استخراج بر مقدار اولیه کافئین در نمونه استاندارد به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز داده‌های قهوه‌های کلاسیک و تجاری با دو روش آماری متفاوت انجام گرفت. جهت مقایسه میانگین غلظت کافئین درقهوه‌های کلاسیک از تحلیل واریانس دو عامله (با در نظر گرفتن روش تهیه و نوع پودر قهوه استفاده شده و بدون در نظر گرفتن سایر عوامل تاثیرگذار) در سطح معنی‌داری ۹۵٪ استفاده شد. در حالیکه برای مقایسه میانگین غلظت کافئین در قهوه‌های تجاری از روش تحلیل وارانس یک عامله (با توجه به روش‌های تهیه متفاوت و بدون نظر گرفتن نسبت قهوه به آب و نوع قهوه مصرفی) در سطح معنی‌داری ۹۵٪ استفاده شد. برای مقایسه میانگین مقدار کافئین در دو روش استخراج متداول و کچرز، با توجه به اینکه تنها دو عامل موضوع مقایسه هستند، از آزمون فرض آماری با فرضیه‌های $H_0: \mu_1 > \mu_2$ و $H_1: \mu_2 \leq \mu_1$ بهره گرفته شد. داده‌ها به‌صورت متوسط± انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار Minitab 16 انجام گرفت و نمودارها با استفاده از Excel رسم شدند.

1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2 Polytetrafluoroethylene (PTFE)
3 Diod Array Detector (DAD)
4 Percentage of Recovery
5 Limit of Detection (LOD)
6 Limit of Quantification (LOQ)

نتایج و بحث

اعتبارسنجی روش آنالیز

روش کروماتوگرافی مورد نظر جهت آنالیز کافئین در ابتدا مورد ارزیابی قرار گرفت تا صحت و دقت آن مورد تایید قرار گیرد. روش مورد استفاده امکان آنالیز کافئین را در زمانی کمتر از ۵ دقیقه فراهم آورد. پاسخ آشکارساز به کافئین در محدوده غلظتی ۲۵–۲۰۰ μg/mL خطی بوده و ضریب تعیین ۰/۹۹۹گزارش شد. میزان LOD و LOQ به‌ترتیب با استفاده از نسبت سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ محاسبه شدند و به‌ترتیب مقادیر ۴/۹ μg/mL و ۱۲/۹ μg/mL به‌دست آمدند. روش استخراج متداول منجر به حصول مقادیر قابل قبولی برای درصد بازیابی شد (۱۰۱/۵ درصد) که بیانگر کارایی این روش جهت استخراج و آنالیز کافئین می‌باشد.

اعتبارسنجی روش، فرایندی است برای تایید اینکه آیا روش آنالیز استفاده شده برای یک آزمایش خاص، تحت شرایط آزمایش مناسب است یا خیر. نتایج حاصل از اعتبارسنجی روش می‌تواند برای قضاوت در مورد کیفیت، پایایی و ثبات نتایج آنالیز مورد استفاده قرار گیرد و بخشی جدایی ناپذیر از روش‌های آنالیز دستگاهی به‌شمار می‌رود. اعتبارسنجی روش مورد استفاده در این پژوهش کاربرد قابل قبول آن را در اندازه‌گیری کافئین نشان داد. Candeias و همکاران (۲۰۰۹) مقدار LOD معادل ۲۰ ng/mL را برای آنالیز کافئین با HPLC گزارش کردند. Jeon و همکاران (۲۰۱۹) مقدار درصد بازیابی کافئین را که طبق روش رایج استخراج شده بودند، ۹۸–۱۰۷٪ گزارش کردند که نتایج حاصل از این پژوهش را تایید می‌کند (Jeon *et al*., 2019). به‌طور مشابه، درصد بازیابی ۹۷٪ (Fujioka and Shibamoto 2008)، و ۹۹٪ (Casal *et al*., 2000) نیز در مطالعات دیگر گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط Rivelli و همکاران (۲۰۰۷)، مقادیر ۰/۰۳۷ μg/mL و ۰/۱۲۲ به‌ترتیب برای LOD و LOQ گزارش شدند. همچنین درصد بازیابی ۹۹/۹٪ حاصل شد (Rivelli *et al*., 2007). به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش از نظر درصد بازیابی و نیز حداقل مقدار قابل تشخیص یا اندازه‌گیری، با نتایج سایر محققان همخوانی داشته و مقادیر حاصل در محدوده قابل قبول و استفاده شده در سایر مطالعات قرار دارد بنابراین داده‌های حاصل پایایی و ثبات لازم برای قضاوت در مورد نتایج حاصل را خواهد داشت.

میزان کافئین در انواع قهوه

قهوه‌های کلاسیک

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقدار کافئین در نوشیدنی‌های تولید شده از قهوه ربوستا، به مراتب بیشتر از عربیکا است. به‌عنوان مثال میانگین میزان کافئین قهوه موکا تهیه شده از دانه‌های ربوستا از ۲۶ ±۱۰۴۴ به حدود ۲۱ ±۴۹۸ میلی‌گرم بر لیتر در قهوه موکا از نوع عربیکا کاهش یافته است (*p*<۰/۰۵). به تفاوت در میانگین میزان کافئین میان قهوه عربیکا و ربوستا در سایر منابع اشاره شده است (Casal *et al*., 2000; Tfouni *et al*., 2014; Tfouni *et al*., 2012)، لذا نتایج این بخش با تحقیقات انجام شده همخوانی دارد.

جدول ۲- غلظت کافئین (mg/L) در انواع قهوه تهیه شده از دانه‌های عربیکا و ربوستا

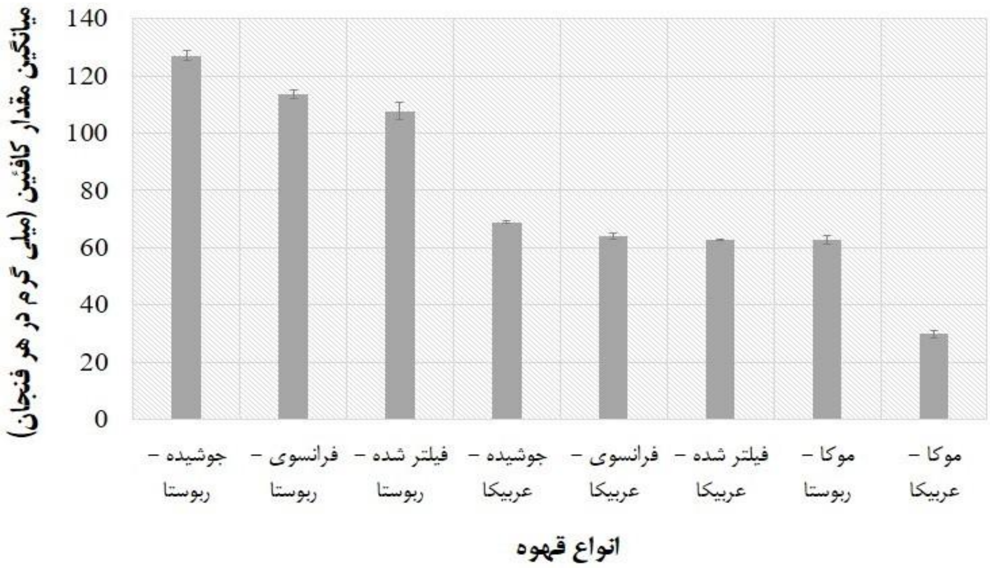
میانگین غلظت کافئین (mg/L)	نسبت قهوه به آب	قهوه‌های کلاسیک*
۸۴۷/۰± ۱۰/۸۵ [aB]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه جوشیده- ربوستا**
۷۵۵/۸۴± ۱۰/۰۷ [aC]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه فرانسوی- ربوستا**
۱۰۴۴/۵۵± ۲۶/۹۵ [aA]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه موکا- ربوستا**
۷۱۷/۷۶± ۲۰/۵۵ [aD]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه فیلتر شده- ربوستا**
۴۵۹/۲۷± ۳/۰۳ [bB]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه جوشیده- عربیکا**
۴۲۵/۷۷± ۷/۰۸ [bC]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه فرانسوی- عربیکا**
۴۹۸/۳۳± ۲۱/۸۰ [bA]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه موکا- عربیکا**
۴۱۸/۵۹± ۱/۷۸ [bC]	۷/۵ g /۱۰۰ mL	**قهوه فیلتر شده- عربیکا**

* در قهوه‌های کلاسیک، حروف (a,b, ...) در ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین هر نوشیدنی تهیه شده از قهوه ربوستا با نوع متناظر آن در نوشیدنی‌های تهیه شده با قهوه عربیکا است. حروف بزرگ (A, B, ...) بیانگر اختلاف معنی‌دار بین انواع قهوه در هر گروه عربیکا یا ربوستا است.

کافئین حلالیت متوسطی در آب ۲۵ درجه دارد (حدود ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ولی با افزایش دما به ۱۰۰ درجه، حلالیت نیز به‌طور قابل توجهی افزایش یافته و به حدود ۶۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز می‌رسد (Angeloni *et al*., 2019). در نتیجه غلظت بالای کافئین در نوشیدنی‌های قهوه دور از انتظار نیست. زمانی که مقیاس اندازه‌گیری کافئین، غلظت بر حسب میلی‌گرم بر لیتر بود، بیشترین میزان کافئین در قهوه موکا به‌دست آمد. بعد از آن قهوه‌های جوشیده، فرانسوی و فیلتر شده به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. این ترتیب در هر دو واریته عربیکا و ربوستا مشاهده شد. یکی از دلایل افزایش استخراج کافئین از قهوه موکا را می‌توان به فشار اعمال شده طی استخراج نسبت

داد که درصد استخراج ترکیبات را نیز افزایش می‌دهد. در حقیقت، قهوه موکا جزء نوشیدنی‌های تهیه شده تحت فشار طبقه‌بندی می‌شود (Petracco, 2001). بیشتر بودن میزان کافئین در قهوه موکا نسبت به جوشیده را می‌توان به دمای آب نیز نسبت داد. از آنجاییکه مخزن آب در قهوه ساز موکا تا حدی بسته است، دمای آب می‌تواند اندکی افزایش یابد و این افزایش هرچند اندک، تاثیر قابل توجهی بر میزان استخراج کافئین خواهد داشت (Albanese *et al*., 2009). به کافئین بیشتر قهوه موکا (۷ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) نسبت به قهوه فرانسوی (۵/۵ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) و قهوه فیلتر شده (۴/۵ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) در سایر تحقیقات (Gloess et al., 2013) نیز اشاره شده است. همچنین، همانطور که سایر محققین گزارش کردند، در قهوه جوشیده، زمان تماس پودر قهوه و آب نسبتا زیاد است بنابراین استخراج کافئین بیشتر از نوشیدنی‌هایی مانند قهوه فیلتر شده خواهد بود (Tfouni et al., 2014). Angeloni و همکاران (۲۰۱۹) میزان کافئین در قهوه موکا (۱/۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را تقریبا ۳ برابر میزان کافئین در قهوه فرانسوی (۰/۵۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش کردند (Angeloni *et al*., 2019) که نتایج پژوهش ما را تایید می‌کند. اگرچه در تحقیق ما، میزان کافئین موکا سه برابر فرانسوی نبود ولی تفاوت مقدار در این دو نوشیدنی معنادار گزارش شد ($p<0/05$). در پژوهش حاضر، میزان کافئین در قهوه فیلتر در محدوده ۴۱۸ الی ۷۱۷ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمده که با نتایج تحقیق Jeon و همکاران (۲۰۱۷) که میزان کافئین انواع قهوه فیلتر شده را اندازه‌گیری کردند (۵۷۶–۴۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) مطابقت داشت (Jeon *et al*., 2017).

نتایج این بخش بر حسب میانگین مقدار کافئین در فنجان، در شکل ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است اگرچه مقدار کافئین در برخی نوشیدنی‌ها در مقیاس میلی‌گرم بر لیتر زیاد است ولی زمانی که مقدار در هر فنجان مورد بررسی قرار می‌گیرد نتایج متفاوتی حاصل خواهد شد. به عنوان مثال، اگرچه قهوه موکا (عربیکا و ربوستا) بالاترین میانگین غلظت کافئین را دارند ولی چون در فنجان‌های کوچک ۶۰ میلی لیتری سرو می‌شود، مصرف کننده مقادیر کمتری از کافئین را نسبت به سایر انواع مانند فیلتر شده، دریافت خواهد کرد.



شکل ۲- میانگین مقدار کافئین در انواع قهوه کلاسیک (میلی‌گرم در هر فنجان مصرفی). اندازه هر فنجان عبارت است از: قهوه جوشیده، فرانسوی، فیلتر شده (۱۵۰ میلی‌لیتر)، موکا (۶۰ میلی‌لیتر)

قهوه‌های تجاری

به منظور بررسی بهتر تاثیر روش‌های تهیه قهوه بر میزان کافئین، انواع پودرهای تجاری قهوه از بازار تهیه شده و قهوه‌ها به روش نوشته شده روی برچسب محصول تهیه شدند. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، نسبت قهوه به آب، در تهیه این سری از قهوه‌ها یکسان نبود. لازم به ذکر است که پودرهای تجاری قهوه معمولا مخلوطی از عربیکا و ربوستا هستند تا علاوه بر عطر و طعم خاص حاصل از قهوه عربیکا، خصوصیاتی مانند قوام، اسیدیته و نیز کافئین بیشتر را از قهوه ربوستا تامین کنند. در این میان، انواع اسپرسو بویژه قهوه پاد بیشترین میانگین مقدار کافئین (میلی‌گرم بر لیتر) را به خود اختصاص دادند درحالیکه، قهوه فوری و سرد کمترین میزان کافئین را دارا بودند.

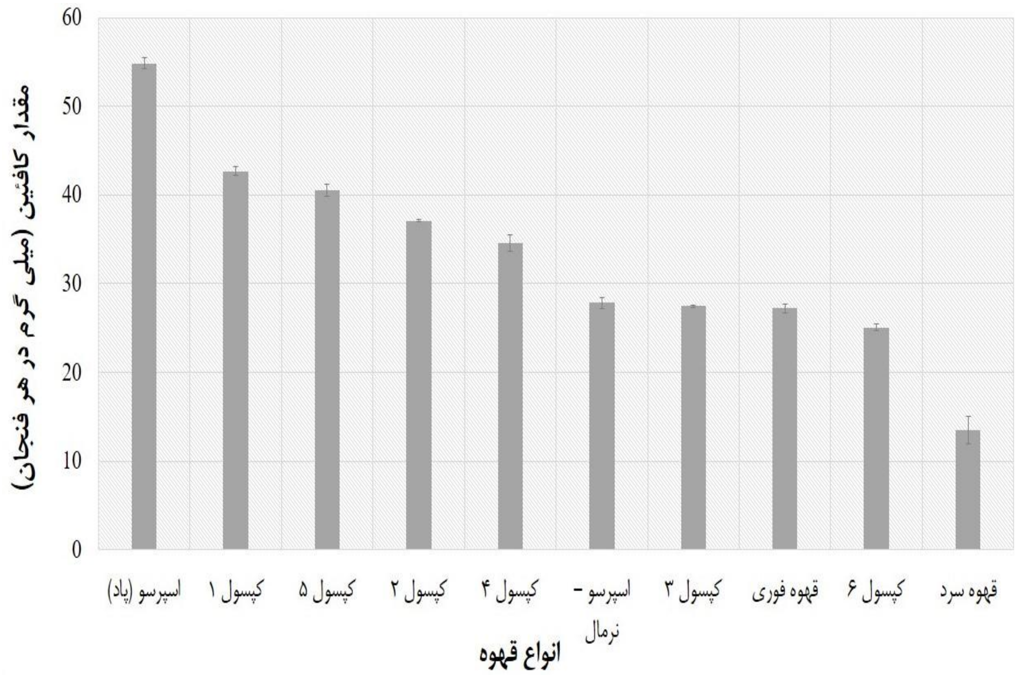
در این میان، قهوه اسپرسو (پاد، نرمال یا نوع کپسولی) از انواع رایج تهیه قهوه در دنیا به‌شمار می‌رود که روزبه‌روز بر طرفداران آن نیز اضافه می‌شود (Albanese *et al*., 2009). لذا در این پژوهش میزان کافئین انواع مختلفی از قهوه اسپرسو مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که

مشخص است، قهوه اسپرسو از نوع پاد، بیشترین میزان کافئین را به‌خود اختصاص داد که بیشتر از قهوه اسپرسو نرمال بود. این نتایج با در نظر گرفتن ماهیت واریته قهوه به‌کار رفته برای تولید اسپرسو (پاد) که مخلوطی از عربیکا و ربوستا بود و همچنین مقدار زیاد قهوه در هر پاد (حدود ۷ گرم)، قابل توجیه است.

جدول ۳- میانگین غلظت کافئین (mg/L) در انواع قهوه تهیه شده از پودرهای تجاری موجود در فروشگاه‌ها

قهوه‌های تجاری*	نسبت قهوه به آب	میانگین غلظت کافئین (mg/L)
قهوه اسپرسو (پاد)	۷/۰۸ g /۴۰ mL	۱۳۷۱/۳۸± ۱۶/۷۳ a
اسپرسو نرمال	۷/۵ g /۴۰ mL	۶۹۶/۶۶±۱۵/۱۷ e
کپسول ۱	۶/۰۱ g /۴۰ mL	۱۰۶۷/۶۱± ۱۲/۶۹ c
کپسول ۲	۵/۰۱ g /۴۰ mL	۹۲۷/۶۷± ۲/۹۷ d
کپسول ۳	۵/۰۱ g /۴۰ mL	۶۸۶/۶۸± ۲/۷۹ e
کپسول ٤	۶/۱۳ g /۴۰ mL	۱۱۵۳/۳۸± ۱/۵۲ b
کپسول ٥	۵/۱۹ g /۴۰ mL	۱۰۱۲/۹۳± ۱۷/۷۳ c
کپسول ٦	۵/۷۱ g /۴۰ mL	۶۲۶/۴۲± ۹/۹۴ ef
قهوه فوری	۲/۰ g /۵۰ mL	۵۴۴/۷۳± ۹/۷۵ g
قهوه سرد	۸/۰ g /۲۴۰ mL	۵۶/۰۴± ۶/۴۷ h

* در قهوهای تجاری، حروف (a,b, …) در ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین انواع قهوه این گروه است.



شکل ۳- مقدار کافئین در انواع قهوه تجاری (میلی‌گرم در هر فنجان مصرفی). اندازه هر فنجان عبارت است از: اسپرسو اعم از پاد، نرمال، کپسول (٤۰ میلی‌لیتر)، قهوه فوری (۵۰ میلی‌لیتر)، قهوه سرد (٢٤۰ میلی‌لیتر).

چراکه اسپرسو نرمال از انواع عربیکا تهیه شده بود که حاوی مقدار کافئین کمتری نسبت به ربوستا هستند. در تحقیقات مشابه، مقدار کافئین در انواع قهوه اسپرسو تهیه شده از پودر قهوه و یا کپسول بین ۴۰ الی ۶۳ میلی‌گرم در هر فنجان گزارش شده است (Gloess *et al.*, 2013). Albanese و همکاران (۲۰۰۹) هر پاد حاوی قهوه را با ۲۵ میلی‌لیتر آب استخراج کردند و میزان کافئین هر فنجان به‌طور متوسط ۲/۹ و ۴/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برای پودر عربیکا و ربوستا به‌دست آمد (Albanese *et al.*, 2009). نتایج این تحقیق به مراتب

بیشتر از مقادیر حاصل از پژوهش ما است (۱/۳۷-۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که می‌تواند با نسبت متفاوت پودر به قهوه و نیز ترکیب پودری (عربیکا و ربوستا) در پژوهش ما توجیه شود. نتایج مشابه در تحقیق Angeloni و همکاران (۲۰۱۹) نیز با پژوهش ما مطابقت نداشت به‌نحوی که میزان کافئین انواع اسپرسو به‌طور میانگین ۴/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد که از مقادیر حاصل از پژوهش ما بیشتر بود. یکی از دلایل این عدم تطابق، مصرف مقدار بیشتر پودر قهوه برای تهیه یک فنجان نوشیدنی در این تحقیق است (Angeloni *et al.*, 2019). در تحقیق مذکور یک نمونه قهوه سرد نیز مورد آزمون قرار گرفت که نتایج آن (۰/۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیز بیشتر از پژوهش ما (۰/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش شد. در تحقیق دیگری، انواع قهوه فوری مورد آنالیز قرار گرفتند و مقادیر ۲۳ الی ۷۱ میلی‌گرم کافئین در هر فنجان ۱۰۰ میلی‌لیتر حاصل شد (Jeon *et al.*, 2019) که تاییدکننده نتایج حاصل از پژوهش ما می‌باشد. همانند قهوه‌های کلاسیک، نتایج این بخش در شکل ۳ بر حسب میانگین مقدار کافئین در هر فنجان نیز گزارش شده است که تصویر بهتری از میزان دریافت کافئین توسط مصرف‌کنندگان را در اختیار بگذارد. از آنجاکه انواع اسپرسو در فنجان‌های کوچک ۴۰ یا ۵۰ میلی‌لیتری مصرف می‌شوند، نتایج این بخش به‌لحاظ ترتیب میانگین مقدار کافئین، با جدول ۳ شباهت زیادی دارد. مورد قابل توجه قهوه سرد است. به لحاظ غلظت میلی‌گرم بر لیتر، قهوه سرد تفاوت بسیار قابل توجهی با انواع اسپرسو دارد (۵۶ میلی‌گرم بر لیتر در قهوه سرد در مقایسه با ۱۳۷۱ میلی‌گرم بر لیتر در قهوه پاد)، ولی با در نظر گرفتن مقدار مصرف در هر فنجان، اگرچه تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار است، ولی میزان اختلاف بسیار کاهش می‌یابد (۱۳ میلی‌گرم بر فنجان در قهوه سرد در مقایسه با ۵۶ میلی‌گرم بر فنجان در قهوه پاد).

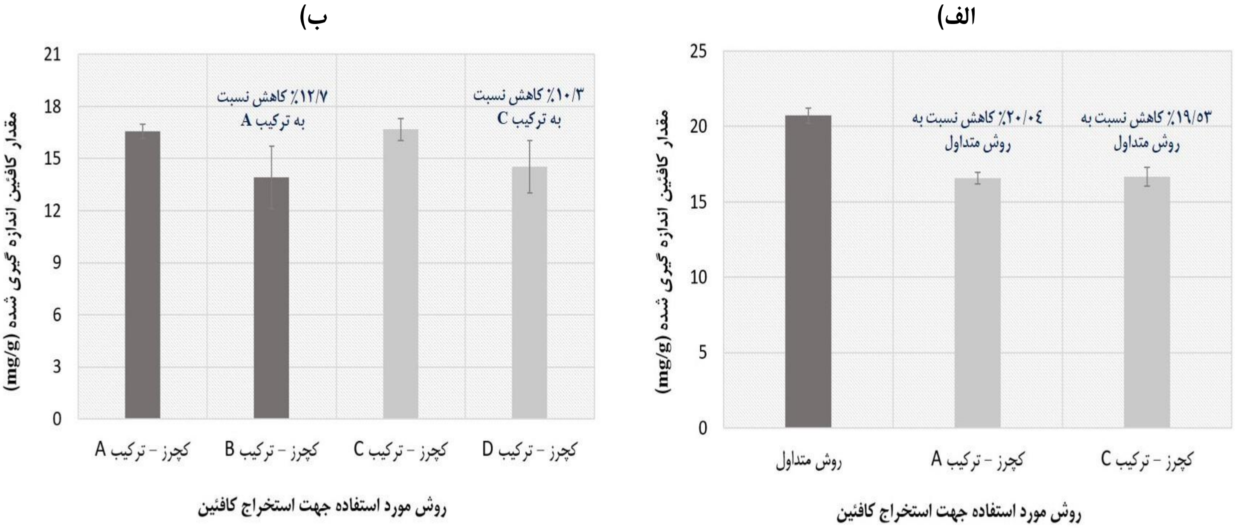
تاثیر روش کچرز بر استخراج کافئین

نقش حلال

شکل ۴ (الف)، نقش استفاده از حلال استونیتریل یا اتیل استات (ترکیب A و C از جدول ۱) را در حذف کافئین در مقایسه با مقدار واقعی این ترکیب که توسط روش متداول محاسبه شده است، نشان می‌دهد. طبق نتایج حاصل، جایگزینی استونیتریل با اتیل استات تاثیر قابل توجهی بر حذف کافئین نشان نداد ($p \geq ۰/۰۵$) و هر دو حلال از عملکرد تقریبا یکسانی در این زمینه برخوردار بودند. با این حال، نتایج بیانگر اختلاف معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) میان روش کچرز و روش متداول بود، به‌طوری که مقدار قابل توجهی از کافئین توسط روش کچرز حذف شد. نتایج نشان داد که فارغ از نوع حلال مورد استفاده، مقادیر حاصل از استخراج به روش کچرز به کمک ترکیب A و C، حدود ۲۰٪ کمتر از مقادیر حاصل از روش متداول بود که بیانگر کارایی این روش در حذف قابل توجه کافئین از نمونه مورد مطالعه است. نتیجه‌گیری دیگری که می‌توان از این یافته داشت این است که اگر هدف اندازه‌گیری دقیق کافئین باشد، روش کچرز، روش مناسبی نخواهد بود چراکه بخش قابل توجهی از آن جذب جاذب‌ها شده و حذف می‌شود.

استونیتریل در روش کچرز کاربرد گسترده داشته و بویژه برای استخراج ترکیبات قطبی، کاربرد گسترده دارد. از طرفی برای استفاده در روش‌های کروماتوگرافی حلال مطلوبی به‌شمار می‌آید. در مقابل، اتیل استات حلالی است که معمولا جهت استخراج PAHها (گروهی از ترکیبات سرطان‌زا) کاربرد دارد و همانطور که قبلا نیز اشاره شد، حضور کافئین در آنالیز PAHها اختلال ایجاد می‌کند (Sadowska-Rociek, Surma and Cieślik 2014). در دمای ۲۵ درجه، حلالیت کافئین در اتیل استات (۲/۵٪ وزنی/ وزنی یا ۲۲/۵ mg/mL) بیشتر از آب (۲/۲٪ وزنی/ وزنی) است (Vuon and Roach 2014). به‌لحاظ مقادیر وزنی/ حجمی نیز حلالیت کافئین در آب ۲۰ mg/mL گزارش شده است (Al-Maaieh and Flanagan 2002). در نتیجه، تمایل کافئین برای حضور در فاز آلی بیشتر از آبی است.

نتایج مشابهی توسط Sadowska-Rociek و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده شد. به‌طوریکه استخراج PAHها از چای با اتیل استات منجر به استخراج بخش قابل توجهی از کافئین شد (Sadowska-Rociek, Surma and Cieślik 2014). به‌طور مشابه در تحقیق Shalmashi و همکاران (۲۰۱۰)، استخراج کافئین با اتیل استات بازده بالاتری نسبت به آب داشت (Shalmashi and Golmohammad 2010). حلالیت کافئین در استونیتریل نیز بیشتر از آب است. Yu و همکاران (۲۰۱۰)، حلالیت کافئین در استونیتریل را در دمای ۲۵ درجه، معادل ۰/۱۵۳۵ g/kg گزارش کردند (Yu, Chow and Tan 2010) که با در نظر گرفتن وزن مولی کافئین (۱۹۴/۲ g/mol) و دانسیته استونیتریل (۰/۷۸۶ g/mL)، معادل ۲۳/۴ mg/mL خواهد بود. داده‌های Sadowska-Rociek و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که به هنگام استفاده از اتیل استات، کافئین استخراجی به مراتب بیشتر از زمانی است که از استونیتریل به عنوان حلال استفاده شود. نتایج ما نیز تا حدی نتایج تحقیق مذکور را تایید می‌کند و مقدار کافئین حاصل از اتیل استات اندکی بیشتر از استونیتریل بود ولی این تفاوت در پژوهش ما معنادار نبود ($p \geq ۰/۰۵$). این نتایج متفاوت می‌تواند به تفاوت رفتار کافئین در محیط‌هایی با دو حلال آب/ استونیتریل در مقایسه با آب/ اتیل استات توجیه شود. در نتیجه، درصورتیکه که هدف آنالیز سایر آلاینده‌ها با روش کچرز باشد، کاربرد استونیتریل پیشنهاد می‌شود.



شکل ٤- الف) نقش حلال در استخراج کافئین در مقایسه با روش متداول بر پایه محلول‌های کاریز و ب) نقش جاذب‌های PSA و C18 در استخراج کافئین

نقش جاذب

برای این منظور، استفاده تکی از جاذب PSA (ترکیب A و C از جدول ۱) در کنار کاربرد همزمان PSA و C18 (ترکیب B و D از جدول ۱) در اندازه‌گیری کافئین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد، فارغ از نوع حلال مورد استفاده، افزودن جاذب C18 حذف کافئین از نمونه را به‌طور میانگین به میزان حدود ۱۱٪ افزایش داد (شکل ۴ ب). این کاهش در هر دو حلال مورد مطالعه معنادارگزارش شد ($p \leq$ ۰/۰۵) به نحوی که میزان کافئین اندازه‌گیری شده با کمک استونیتریل و اتیل استات به هنگام استفاده همزمان از جاذب های PSA و C18، به‌ترتیب در حدود ۳۲ و ۲۹٪ کمتر از مقدار اندازه‌گیری شده به روش رایج بود. لازم به ذکر است که در روش کچرز، نسبت نمک به جاذب و حلال باید همواره رعایت شود تا نتایج مطلوب حاصل شود. به عنوان مثال در این پژوهش، در مرحله استخراج، سولفات منیزیم ۴ برابر کلریدسدیم بود و در قسمت پاکسازی، سولفات منیزیم ۶ برابر جاذب‌ها در نظر گرفته شد. لذا افزایش در مقدار جاذب‌ها یا مقدار حلال‌ها، تغییر در کل فرایند استخراج را به همراه خواهد داشت.

بر خلاف سیستم استخراج فاز جامد (SPE)[1]، در روش کچرز برای پاکسازی عصاره از استخراج فاز جامد پراکنده (dSPE)[2] استفاده می‌شود که در آن پاکسازی در داخل محلول توده[3] صورت می‌گیرد و نیازی به انواع سیستم‌های خلاء، ستون‌های SPE و انواع پیش تیمارها نیست و در نتیجه فرایند ساده‌تر می‌شود (Varela-Martínez *et al*., 2020).

جاذب PSA نوعی تبادل کننده آنیونی ضعیف[4] است و به این ترتیب عصاره را از قندها، اسیدهای چرب و سایر اسیدها پاک می‌کند. اگرچه در حضور آن، رنگ‌ها مانند آنتوسیانین‌ها نیز تا حدی حذف می‌شوند (Kim *et al*., 2019). در مقابل C18، جاذبی هیدروفوبیک است که برای حذف ترکیبات غیرقطبی مثل چربی‌ها گزینه مناسبی است (Sadowska-Rociek *et al*., 2014). خصوصا برای عصاره‌هایی مانند عصاره قهوه که مقادیر بالایی چربی دارد، می‌تواند گزینه مناسبی باشد. در نتیجه حضور این دو جاذب می‌تواند عصاره را تا حد زیادی از ترکیبات مزاحم پاک کند. در این میان، اگرچه کافئین ترکیبی قطبی محسوب می‌شود، با این وجود، احتمال می‌رود که برهمکنش هیدروفوب بین گروه‌های متیل کافئین و گروه‌های غیرقطبی جاذب‌ها (بویژه در C18) منجر به حذف بیشتر کافئین از عصاره شود استفاده همزمان از PSA و C18 در حضور استونیتریل برای آنالیز برخی آفت‌کش‌ها در انواع دانه‌ها مانند ذرت، قهوه، کاکائو، موز و غیره به صورت موفقیت آمیزی استفاده شده است (Galani *et al*., 2018). در تحقیق دیگری نیز کاربرد مثبت C18 به‌عنوان یک جاذب جهت حذف ترکیبات مزاحم برای آنالیز سموم قارچی در قهوه به اثبات رسید (Reichert *et al*., 2018).

1 Solid Phase Extraction (SPE)
2 Dispersive Solid Phase Extraction (dSPE)
3 Bulk solution
4 Weak anion exchanger

نتیجه‌گیری

قهوه از رایج‌ترین نوشیدنی‌ها در دنیا به‌شمار می‌رود که حاوی ترکیبات مختلف با خواص سلامتی‌زایی متعدد است. در این میان، می‌توان از کافئین به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب شیمیایی موجود نام برد که به مقدار زیاد در قهوه یافت می‌شود. در تحقیق حاضر محتوای کافئین ۱۸ نوع قهوه اعم از انواع کلاسیک (جوشیده، فرانسوی، موکا و فیلترشده تهیه شده از قهوه عربیکا یا ربوستا) یا تجاری (انواع اسپرسو، فوری و قهوه سرد) مورد آزمون قرار گرفت و نتایج به‌صورت غلظت در لیتر یا در هر فنجان، گزارش شد. تفاوت در نحوه تهیه قهوه، منجر به استخراج مقادیر متفاوت کافئین به داخل نوشیدنی نهایی شد. به‌طور کلی میزان کافئین در قهوه اسپرسو (پاد) بیشترین و در قهوه سرد کمترین بود. با این حال زمانی که مقدار در هر فنجان مورد مطالعه قرار گرفت، انواع کلاسیک خصوصا قهوه جوشیده- ربوستا بیشترین مقدار (۱۲۰ میلی‌گرم در ۱۵۰ میلی‌لیتر) را به‌خود اختصاص دادند و در مقابل انواع اسپرسو مقادیر متوسطی از کافئین در محدوده ۲۵ الی ۵۴ میلی‌گرم در ۴۰ میلی‌لیتر را دارا بودند.

از طرف دیگر، حضور کافئین به مقدار زیاد در انواع قهوه یا چای، در آنالیز آلاینده‌ها و سموم که در مقدار کم وجود دارند اختلال ایجاد می‌کند. لذا در این پژوهش اثر اختصاصی روش کچرز از جهت نوع حلال و جاذب‌ها بر حذف کافئین از عصاره قهوه ربوستا نیز به‌عنوان یک سیستم مدل، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر تاثیر قابل توجه این روش در حذف کافئین بود به‌نحوی که در بهترین شرایط (حلال استونیتریل و مصرف همزمان جاذب PSA و C18)، میزان کافئین تا ۳۰٪ نیز کاهش یافت. بررسی اثر حلال نشان داد که نوع حلال در حذف کافئین تاثیر دارد ولی این تاثیر بین حلال استونیتریل و اتیل استات معنادار نبود. با این وجود، نوع جاذب میزان کاهش را به شکل معناداری افزایش داد به نحوی که اضافه کردن جاذب C18، فرایند حذف را تشدید نمود. اگرچه باید در نظر داشت که شرایط نهایی باید به نحوی انتخاب شوند که در عین حال که ترکیبات مزاحم را حذف می‌کنند، منجر به کاهش درصد بازیابی آنالیت هدف نشوند.

تشکر و قدردانی

تحقیق نویسنده مسئول از حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۵۰۱۷۱/۲) برخوردار بوده است.

منابع

Al-Maaieh, Ahmad, and Douglas R Flanagan. 2002. "Salt effects on caffeine solubility, distribution, and self-association." *Journal of pharmaceutical sciences* 91(4):1000-1008.

Albanese, D., M. Di Matteo, M. Poiana, and S. Spagnamusso. 2009. "Espresso coffee (EC) by POD: Study of thermal profile during extraction process and influence of water temperature on chemical–physical and sensorial properties." *Food Research International* 42(5-6):727-732.

Anastassiades, Michelangelo, Steven J Lehotay, Darinka Štajnbaher, and Frank J Schenck. 2003. "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce." *Journal of AOAC international* 86(2):412-431.

Angeloni, Giulia, Lorenzo Guerrini, Piernicola Masella, Maria Bellumori, Selvaggia Daluiso, Alessandro Parenti, and Marzia Innocenti. 2019. "What kind of coffee do you drink, An investigation on effects of eight different extraction methods." *Food Research International*. 116:1327-1335.

Bell, Leonard N., Clinton R. Wetzel, and Alexandra N. Grand. 1996. "Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques." *Food Research International* 29(8):785-789.

Brice, Carolyn, and Andrew Smith. 2001. "The effects of caffeine on simulated driving, subjective alertness and sustained attention." Human Psychopharmacology: *Clinical and Experimental* 16(7):523-531.

Buerge, Ignaz J., Thomas Poiger, Markus D. Müller, and Hans-Rudolf Buser. 2003. "Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters." *Environmental Science & Technology* 37(4):691-700.

Candeias, Sara X., Eugenia Gallardo, and Ana C. Matos. 2009. "Caffeine Content of Retail Market Coffee in Portugal." *Food Analytical Methods* 2(4):251-256.

Casal, S., M. B. Oliveira, M. R. Alves, and M. A. Ferreira. 2000. "Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8):3420-354.

Dafouz, Raquel, Neus Cáceres, José Luis Rodríguez-Gil, Nicola Mastroianni, Miren López de Alda, Damià Barceló, Ángel Gil de Miguel, and Yolanda Valcárcel. 2018. "Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk? A regional and global study." *Science of the total environment* 615:632-642.

Danish, Mohammed. 2020. "Application of date stone activated carbon for the removal of caffeine molecules from water." Materials Today: Proceedings.

Fujioka, K., and T. Shibamoto. 2008. "Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees." *Food Chemistry* 106(1):217-221.

Galani, Joseph H. Y., Michael Houbraken, Abukari Wumbei, Joseph F. Djeugap, Daniel Fotio, and Pieter Spanoghe. 2018. "Evaluation of 99 Pesticide Residues in Major Agricultural Products from the Western Highlands Zone of Cameroon Using QuEChERS Method Extraction and LC-MS/MS and GC-ECD Analyses." *Foods* 7(11):184.

Gloess, Alexia N., Barbara Schönbächler, Babette Klopprogge, Lucio D`Ambrosio, Karin Chatelain, Annette Bongartz, André Strittmatter, Markus Rast, and Chahan Yeretzian. 2013. "Comparison of nine common coffee extraction methods: instrumental and sensory analysis." *European Food Research and Technology* 236(4):607-627.

Hillebrand, Olav, Karsten Nödler, Tobias Licha, Martin Sauter, and Tobias Geyer. 2012. "Caffeine as an indicator for the quantification of untreated wastewater in karst systems." *Water research* 46(2):395-402.

Jeon, Jong-Sup, Han-Taek Kim, Il-Hyung Jeong, Se-Ra Hong, Moon-Seog Oh, Kwang-Hee Park, Jae-Han Shim, and A. M. Abd El-Aty. 2017. "Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions." *Journal of Chromatography* B 1064:115-123.

Jeon, Jong-Sup, Han-Taek Kim, Il-Hyung Jeong, Se-Ra Hong, Moon-Seog Oh, Mi-Hye Yoon, Jae-Han Shim, Ji Hoon Jeong, and A. M. Abd El-Aty. 2019. "Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products." *Journal of Advanced Research* 17:85-94.

Kim, Leesun, Danbi Lee, Hye-Kyung Cho, and Sung-Deuk Choi. 2019. "Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals." *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 22:e00063.

Li, Shulan, Bingshu He, Jun Wang, Juan Liu, and Xianmin Hu. 2020. "Risks of caffeine residues in the environment: Necessity for a targeted ecopharmacovigilance program." *Chemosphere* 243:125343.

Mussatto, Solange I., Ercília M. S. Machado, Silvia Martins, and José A. Teixeira. 2011. "Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues." *Food and Bioprocess Technology* 4(5):661-672.

Nawrot, P., S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz, and M. Feeley. 2003. "Effects of caffeine on human health." *Food Additives & Contaminants* 20(1):1-30.

Petracco, M. 2001. "Technology IV: Beverage Preparation: Brewing Trends for the New Millennium." Pp. 140-64 in Coffee: Recent developments, edited by R. J. Clarke and O. G. Vitzthum. UK: Blackwell Sience.

Reichert, B., A. de Kok, I. R. Pizzutti, J. Scholten, C. D. Cardoso, and M. Spanjer. 2018. "Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis." *Anal Chim Acta* 1004:40-50.

Rivelli, Diogo Pineda, Vanessa Vitoriano da Silva, Cristina Dislich Ropke, Denise Varella Miranda, Rebeca Leite Almeida, Tania Cristina Higashi Sawada, and Silvia Berlanga de Moraes Barros. 2007. "Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of Ilex paraguariensis by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 43:215-522.

Sadowska-Rociek, Anna, Magdalena Surma, and Ewa Cieślik. 2014. "Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea." Environ Sci Pollut Res Int 21(2):1326-1338.

Sereshti, Hassan, and Soheila Samadi. 2014. "A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages." *Food Chemistry* 158:8-13.

Shalmashi, A, and F Golmohammad. 2010. "Solubility of caffeine in water, ethyl acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane, and acetone between 298 and 323 K." Latin American applied research 40(3):283.

Stamatis, Nikolaos K., and Ioannis K. Konstantinou. 2013. "Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece." Journal of Environmental Science and Health, Part B 48(9):800-813.

Surma, Magdalena, Anna Sadowska-Rociek, Ewa Cieślik, and Katarzyna Sznajder-Katarzyńska. 2017. "Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes." *Microchemical Journal* 131:98-102.

Tfouni, Silvia A. V., Larissa B. Carreiro, Camila R. A. Teles, Regina P. Z. Furlani, Katia M. V. A. B. Cipolli, and Mônica C. R. Camargo. 2014. "Caffeine and chlorogenic acids intake from coffee brew: influence of roasting degree and brewing procedure." *International Journal of Food Science & Technology* 49(3):747-752.

Tfouni, Silvia A. V., Camila S. Serrate, Larissa B. Carreiro, Monica C. R. Camargo, Camila R. A. Teles, Kátia M. V. A. B. Cipolli, and Regina P. Z. Furlani. 2012. "Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two Coffea cultivars: Coffea arabica cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and Coffea canephora cv. Apoatã IAC-2258." *International Journal of Food Science & Technology* 47(2):406-415.

Varela-Martínez, Diana A., Javier González-Sálamo, Miguel Ángel González-Curbelo, and Javier Hernández-Borges. 2020. "Chapter 14 - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Extraction." Pp. 399-437 in Liquid-Phase Extraction, edited by Colin F. Poole: Elsevier.

Vuon, Quan V., and Paul D. Roach. 2014. "Caffeine in Green Tea: Its Removal and Isolation." Separation & Purification *Reviews* 43:155–174.

Yu, Zai Qun, Pui Shan Chow, and Reginald BH Tan. 2010. "Operating regions in cooling cocrystallization of caffeine and glutaric acid in acetonitrile." *Crystal growth & design* 10(5):2382-2387.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 173- 186

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۱۸۶-۱۷۳

Caffeine Determination in Various Types of Coffee Brews and Studying the Effect of QuEChERS Method on Its Extraction Compare to Conventional Approach

M. Moeenfard*, P. Khaloo Kermani, Sh. Jaldani, A, Sharif

Received: 2020.04.15
Accepted: 2020.05.16

Introduction: Coffee is the most important and popular beverage in the world. The main differences between coffee and other beverages like tea is the variety of applied brewing techniques. Coffee is a complex chemical mixture of compounds including, caffeine, as a natural alkaloid. Besides its beneficial effect including enhancement in mental activity and alertness as well as improving the cognitive functioning, caffeine indicated adverse effects such as headache and anxiety when it is consumed in higher quantity. In terms of chemical extraction, it can be also considered as an interference when analyzing other pollutants, therefore, its removal from extract is of great interest. Therefore, the present study was designated to investigate the caffeine content of 18 various coffee-related products. Furthermore, the effect of two extraction techniques (QuEChERS and conventional) on caffeine removal from coffee extract was investigated.

Materials and Methods: Coffee brews including classical (boiled, French, moka and filtered coffees) and commercial brews (various types of espresso as well as instant and iced coffees) were prepared using Robusta, Arabica coffee or commercial powders. In conventional extraction approach, a 2.5 mL of coffee sample was treated with 0.1 mL each of Carrez solutions I and II to clarify the sample. The total volume was brought to 50 mL by the addition of 10% methanol (v/v). After centrifugation, the supernatant was filtered and analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) at 273 nm. In QuECHERS approach, the effect of extraction solvent (acetonitrile and ethyl acetate) and sorbents (primary and secondary amines and, octadecyl silane) on caffeine removal was investigated and was compared to conventional approach as reference method. The extraction and clean-up were accomplished by two types of solvents and sorbents in the presence of sodium chloride and magnesium sulfate. Finally, caffeine was determined using HPLC-DAD at 273 nm.

Results and Discussion: According to the results, the two coffee varieties (Arabica and Robusta) were clearly separated by their caffeine contents as Robusta presented higher values in all classical brews. Among the classical brewing techniques, the coffee with the highest content of caffeine was moka brewed from roasted Robusta coffee, with a mean value of 1044 ± 26 mg/L. The caffeine content was also determined per serving (cup size) to determine the actual content received by consumers. Accordingly, among traditional brews the most caffeine-rich coffee was espresso type pod coffee, with a mean value of 1371 ± 16 mg/L, equivalent to 56 ± 0.6 mg/40 mL of serving size. The lowest mean caffeine content (13.4 mg / 240 mL) was found in iced coffee. With regards to caffeine extraction, with recovery of 101%, the conventional method was the most efficient approach for caffeine determination. Caffeine significantly reduced (around 20% compare to conventional approach) when QuEChERS was used as extraction technique which could be valuable for analysis of pesticides, which are usually present in small quantities in food samples like coffee. In general, the use of acetonitrile as well as the simultaneous application of PSA and C18 resulted in a significant decrease in caffeine content of Robusta coffee extract.

Here, different coffee brews were assessed and compared for their caffeine content (mg/mL and mg/serving). Technical differences like coffee varieties, coffee/water ratio or method of brewing (pressurized, fusion, filtering, etc) led to coffee brews with different caffeine profiles. Interestingly, despite the high concentration of caffeine in espresso types brews, they provided moderate coffee in terms of caffeine content per cup. On the other hand, classical methods in particular boiled, French and filtered Robusta coffee were rich in terms of caffeine per cup. When studying caffeine extraction, the efficiency of conventional method was significantly superior to QuEChERS approach as caffeine significantly reduced when QuEChERS was used as extraction method.

Keywords: Caffeine, Coffee, Arabica, Robusta, QuEChERS

(* Corresponding author: moeenfard@ferdowsi.um.ac.ir)